製品コード 7246

研究用

TaKaRa

Human Mitochondrial DNA (mtDNA) Monitoring Primer Set

説明書

v201408Da

Human Mitochondrial DNA (mtDNA) Monitoring Primer Set は、リアルタイム PCR を利用してヒトのミトコンドリア DNA（mtDNA）コピー数を核 DNA（nDNA）を基準として相対的に測定するためのプライマーセットです。本製品には mtDNA と nDNA を検出するためのプライマーペアがそれぞれ 2 種類、合計 4 種類含まれています。各プライマーは Pseudogenes（偽遺伝子）を増幅しないように設計されています。また、マウス由来の DNA は増幅しないよう設計されていますので、iPS 細胞のようにマウス由来のフィーダー細胞を用いる場合においても問題なく使用できます。
本製品では、1 サンプルに対して 4 種類のプライマーペアを使用してリアルタイム PCR を行い、得られた mtDNA と nDNA の Ct 値の差より、mtDNA のコピー数を相対定量にて算出します。本製品を使用することにより、mtDNA コピー数の変動を簡単にモニタリングすることができるため、iPS 細胞等の多能性細胞から肝細胞方向への分化・誘導過程で増加することが報告されている mtDNA コピー数のモニタリングなどに有用です。
本製品に含まれる各プライマーペアは、MightyAmp® for Real Time (SYBR® Plus)（製品コード R075A/B）および SYBR *Premix Ex Taq*™ II (Tli RNaseH Plus)（製品コード RR820S/A/B）で良好に反応することを確認しています。

I. 内容（各プライマー　50 反応分）

1. ND1 Primer Mix（10 μM each）＊1　　50 μl
2. SLCO2B1 Primer Mix（10 μM each）＊2　　50 μl
3. ND5 Primer Mix（10 μM each）＊1　　50 μl
4. SERPINA1 Primer Mix（10 μM each）＊2　　50 μl

＊ 1：ミトコンドリア DNA（mtDNA）用プライマー
＊ 2：核 DNA（nDNA）用プライマー

II. 本プライマーセット以外に必要な試薬、器具、機器（主なもの）

【試薬】

- NucleoSpin Tissue（製品コード 740952.10/.50/.250）
- MightyAmp for Real Time (SYBR Plus)（製品コード R075A/B）または
  SYBR *Premix Ex Taq* II (Tli RNaseH Plus)（製品コード RR820S/A/B）

【器具】

- 各種マイクロピペット
- マイクロピペット用チップ（疎水性フィルター付）
- 0.2 ml 8-strip tube, individual Flat Caps（製品コード NJ600）
  チューブ 1 本ごとにフラットキャップが付いているキャップ付き 8 連 0.2 ml チューブを Thermal Cycler Dice® Real Time System 専用として販売しています。チューブ間のコンタミネーションの危険性が軽減できるので特にお勧めします。

【機器】

- リアルタイム PCR 装置＊
  Thermal Cycler Dice Real Time System *II*（製品コード TP900/TP960）
  Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite*（製品コード TP700/TP760）
  Thermal Cycler Dice Real Time System Single（製品コード TP850/TP870）

  ＊：Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR System（Life Technologies）をご使用の場合、Baseline がフラットになるように、必要に応じて Auto 設定を解除し、Threshold を Manual で設定していただく必要があります。

- 分光光度計

III. 保存

－ 20℃

※ 適切に保存し、受取り後 1 年を目途にご使用ください。
※ 短期間（～ 1 ヵ月）に繰り返し使用する場合には 4℃で保存してください。ただし、本製品は防腐剤を含んでおりませんので、コンタミネーションには十分にご注意ください。

IV. 操作

本製品以外の試薬および装置の操作方法については各製品の取扱説明書も併せてご参照ください。

注意：

核 DNA（nDNA）に比べてミトコンドリア DNA（mtDNA）の存在量は非常に多く、サイズも小さいため、mtDNA が混入する可能性は格段に高くなります。そのため、ヒト DNA を含有する汚染源からサンプルを保護する必要があります。
DNA-OFF™（製品コード 9036）等の DNA コンタミネーション除去溶液による操作エリアや器具類の清掃を行い、各種操作や PCR のセットアップに十分注意を払うことで予防策を講じることができます。定期的に新しい手袋に交換し、エタノールや DNA-OFF 等でピペットを拭くことをお勧めします。また、器具等からのコンタミネーションを防止するために紫外線滅菌キャビネットを使用して PCR のセットアップを行うことも効果的です。

【 操作の流れ 】

評価対象細胞からゲノム DNA（mtDNA を含む）を抽出
　NucleoSpin Tissue 等を使用して高純度の DNA を調製
　↓
リアルタイム PCR 用のマスターミックスを調製し、反応チューブに分注
　↓
各 Primer Mix を添加
　↓
リアルタイム PCR
　mtDNA 上の遺伝子 2 種類、nDNA 上の遺伝子 2 種類を対象にリアルタイム PCR 解析
　↓
データ解析
　mtDNA コピー数を nDNA を基準として相対定量

解析には、Microsoft Office Excel で作成された mtDNA コピー数算出用のファイルが利用できます。タカラバイオウェブサイトからダウンロードしてご利用ください。

URL : http://www.takara-bio.co.jp/mtdna_monitoring_tool/

PCR のセットアップ

本製品では、1 種類の DNA サンプルにつき 4 反応（4 種類のプライマーペアで反応）を行います。
まず、Primer Mix 以外のマスターミックスを調製し、各々のチューブに 24 μl ずつ分注します。必要チューブ分のマスターミックスを調製する際は、下記＜ 1 反応あたり＞の反応系を参考にしてください。最後に各 Primer Mix を 1 μl ずつ分注します。この手順で反応液を調製すると、鋳型分注量の誤差によるバラツキを最小限に抑え、安定した結果を得ることができます。

【Thermal Cycler Dice Real Time System *II* を用いる場合】

※ Thermal Cycler Dice Real Time System *II* の取扱説明書に従って操作してください。

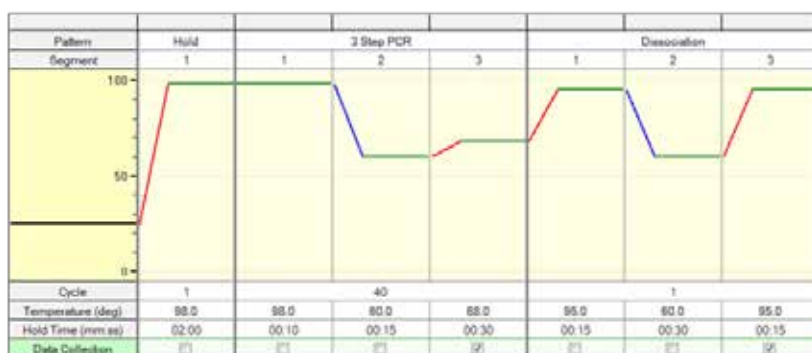
1. 下記に示す反応液を氷上で調製する。

＜ 1 反応あたり＞

	使用量	終濃度
MightyAmp for Real Time (SYBR Plus)（2×） 　または SYBR *Premix Ex Taq* II (Tli RNaseH Plus)（2×）	12.5 μl	1 ×
Primer Mix（10 μM each）	1 μl	0.4 μM each
Genomic DNA（5 ng）*	2 μl	
dH_2O（滅菌蒸留水）	9.5 μl	
Total	25 μl	

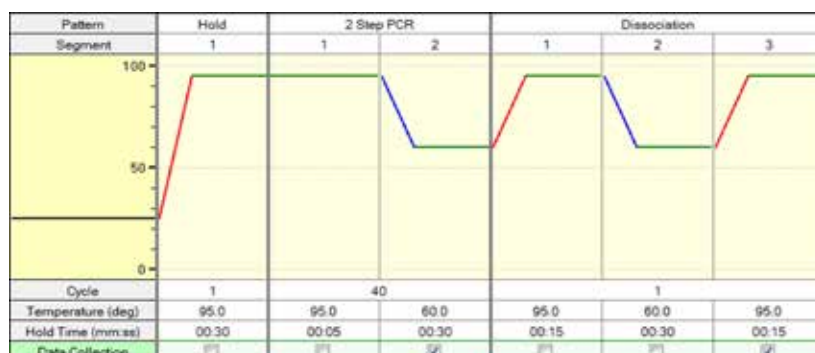
＊：ゲノム DNA の推奨量は 1 反応あたり 1 ～ 100 ng の範囲で添加してください。
推奨量は 10 ng です。
NucleoSpin Tissue 等で調製した高純度 DNA を使用してください。
また、OD_{260}/OD_{280} の比を測定し、高純度であることを確認してください。

2. 下記に示す条件で反応を開始する。

＜ MightyAmp for Real Time (SYBR Plus) を使用する場合＞

Hold（初期変性）
　Cycle：1
　　98℃　　2 分
3 Step PCR
　Cycle：40
　　98℃　10 秒
　　60℃　15 秒
　　68℃　30 秒
Dissociation

※ 使用上の注意

本製品に使用している MightyAmp DNA Polymerase は強力なホットスタート抗体を使用しているので、必ず 98℃ 2 分の初期変性を行い、抗体を熱変性させてください。

＜ SYBR *Premix Ex Taq* II (Tli RNaseH Plus) を使用する場合＞

Hold（初期変性）
　Cycle：1
　　95℃　30 秒
2 Step PCR
　Cycle：40
　　95℃　5 秒
　　60℃　30 秒
Dissociation

3. 反応終了後、データの解析を行い相対定量にてコピー数を算出する。

4 つのターゲットそれぞれについて得られた Ct 値を用いて、mtDNA のコピー数を算出します。解析に用いる mtDNA と nDNA 検出用プライマーペアの組み合わせは、最適化されていますので下記の手順に従ってください。最終的に各プライマーの組み合わせで算出した数値の平均値として mtDNA のコピー数を算出します。
解析には、Microsoft Office Excel で作成された mtDNA コピー数算出用のファイル＊1 が利用できます。Ct 値を入力することで、mtDNA コピー数を算出することができます。反復実験の結果は、最大 5 個まで入力することが可能です。また、最下段には、反復実験で得られた mtDNA コピー数の平均値も算出されますので、必要に応じてご利用ください。

a. ND1/SLCO2B1 ペアの Ct 値の差を求める。（ΔCt1 ＝ SLCO2B1 の Ct 値－ ND1 の Ct 値）
b. 同様に ND5/SERPINA1 ペアの Ct 値の差を求める。（ΔCt2 ＝ SERPINA1 の Ct 値－ ND5 の Ct 値）
c. ΔCt1 およびΔCt2 の値から、2^{N} (N=ΔCt) を求める。
d. c. で得られた 2 つの数値の平均値をコピー数とする。

コピー数計算の一例

Primer	Ct Value	ΔCt	$2^{\Delta Ct}$	平均コピー数
ND1	15.75	ΔCt1 = 8.78	440	574
SLCO2B1	24.53			
ND5	15.04	ΔCt2 = 9.47	709	
SERPINA1	24.51			

＊ 1：タカラバイオウェブカタログの本製品ページからダウンロードしてご利用いただけます。
URL : http://www.takara-bio.co.jp/mtdna_monitoring_tool/

V. 実験例

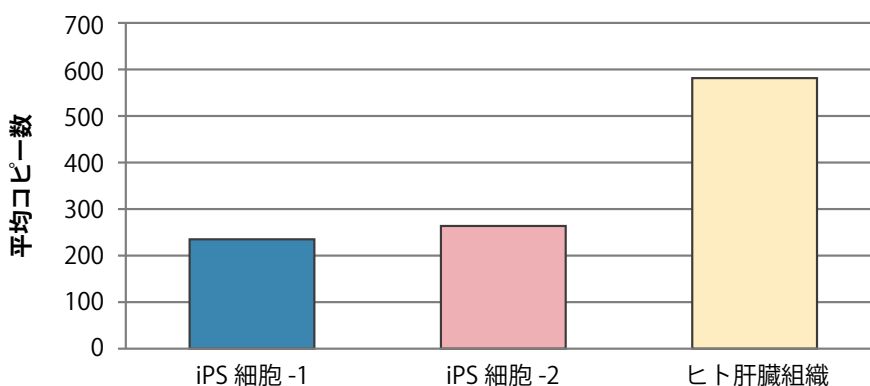
iPS 細胞 2 株および肝臓組織より調製したゲノム DNA（mtDNA 含）を鋳型とした mtDNA コピー数の相対定量結果

【方法】

プロトコールに従い mtDNA コピー数の検出を行った。反応条件および mtDNA コピー数算出方法は、IV. 操作を参照。

【結果】

iPS 細胞等の多能性細胞から肝細胞方向への分化・誘導過程で mtDNA コピー数の増加が報告されています。本実験でも、肝細胞が大部分を占める肝臓組織において、明らかに高い mtDNA コピー数の増加を確認することができました。

Sample	Primer	Ct Value	ΔCt	$2^{\Delta Ct}$	平均コピー数
iPS 細胞 -1	ND1	17.19	7.17	144	231
	SLCO2B1	24.36			
	ND5	16.17	8.31	317	
	SERPINA1	24.48			
iPS 細胞 -2	ND1	17.08	7.37	165	260
	SLCO2B1	24.45			
	ND5	16.19	8.47	355	
	SERPINA1	24.66			
ヒト肝臓組織	ND1	15.75	8.78	440	574
	SLCO2B1	24.53			
	ND5	15.04	9.47	709	
	SERPINA1	24.51			

ミトコンドリア DNA のコピー数の比較

VI. トラブルシューティング

【リアルタイム RT-PCR で増幅がみられない】

- 細胞株や培養条件、組織によっては、mtDNA の含量が非常に少ない場合があります。必要に応じて、使用する鋳型 DNA 量を 1 ～ 100 ng の範囲で至適化してください。
- 極端に純度の低いゲノム DNA（mtDNA を含む）を鋳型として使用することは推奨できません。NucleoSpin Tissue 等で高純度に精製した DNA を使用して増幅の確認を行ってください。
- DNA 抽出は、可能な限り同じ方法で実施してください。異なる方法で調製した場合、純度に大きな差が生じて結果に影響する場合があります。
- リアルタイム PCR 反応液を氷上で調製し、調製後は、反応開始まで遮光して氷上に置いてください。

VII. 関連製品

NucleoSpin Tissue（製品コード 740952.10/.50/.250）
NucleoSpin Tissue XS（製品コード 740901.10/.50/.250）
MightyAmp® for Real Time (SYBR® Plus)（製品コード R075A/B）
SYBR® *Premix Ex Taq*™ II (Tli RNaseH Plus)（製品コード RR820S/A/B）

リアルタイム PCR 装置
　Thermal Cycler Dice® Real Time System *II*（製品コード TP900/TP960）
　Thermal Cycler Dice® Real Time System Single（製品コード TP850/TP870）
　Thermal Cycler Dice® Real Time System *Lite*（製品コード TP700/TP760）

0.2 ml 8-strip tube, individual Flat Caps（製品コード NJ600）
96well Hi-Plate for Real Time（製品コード NJ400）
Sealing Film for Real Time（製品コード NJ500）
DNA-OFF™（DNA コンタミネーション除去溶液）（製品コード 9036）

VIII. 参考文献

Yue Yu *et al.* (2012)Hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells: Relevance to cellular therapies. *Stem Cell Research*, **9**, 196-207

IX. 注意

- 本製品は研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- MightyAmp、Thermal Cycler Dice はタカラバイオ株式会社の、SYBR は Molecular Probes, Inc. の登録商標です。DNA-OFF、*Premix Ex Taq* はタカラバイオ株式会社の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。